หัวข้อวิทยานิพนธ์	การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคผิวหนังและอนุมูลอิสระโดยสารสกัดพืชสมุนไพรบางชนิด	
ผู้เขียน	นางสาววิภาวรรณ ปุ๊คำปวง	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยาประยุกต์)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ผศ.ดร. ยิ่งมณี ตระกูลพัว	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ผศ.ดร. นฤมล ทองไว	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผศ.ดร. สุนีย์ จันทร์สกาว	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

พืชสมุนไพรจำนวน 22 ชนิดที่มีความสอดคล้องกับการใช้เป็นยาพื้นบ้านของไทยได้ถูกคัดเลือกเพื่อประเมิน ฤทธิ์ทางชีวภาพในการทดลองโดยถูกนำมาสกัดด้วยน้ำกลั่น และเอทานอล 95% สารสกัดหยาบที่ได้ของพืชแต่ละชนิดถูกนำมาศึกษาฤทธิ์ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Escherichia coli* O157: H7, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* และ *Propionibacterium acnes* ด้วยวิธี agar disc diffusion และ broth dilution พบว่าสารสกัดเอทานอลของ สบู่เลือดและแห้ม มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้งระหว่าง 8.3-50.0 mm มีค่า MIC และ MBC ระหว่าง 0.03-125 mg/ml เมื่อเปรียบเทียบตัวทำลายที่ใช้ในการสกัด 4 ชนิด ได้แก่ น้ำ เอทานอล เมทานอล และไดคลอโรมีเทนต่อประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบ พบว่า สารสกัดเมทานอล ของแห้มให้ฤทธิ์การยับยั้งดีที่สุดโดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้งระหว่าง 12.3-59.0 mm มีค่า MIC และ MBC อยู่ระหว่าง 0.06-62.5 mg/ml ในขณะที่สารสกัดไดคลอโรมีเทนของสบู่เลือดให้ฤทธิ์การยับยั้งดีที่สุดโดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้งระหว่าง 10.3-45.3 mm มีค่า MIC และ MBC อยู่ระหว่าง 0.12-31.3 mg/ml

เมื่อศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบต่อหน่วยเวลา พบว่า สารสกัดเอทานอลของ คาวตอง พญาวานร และ สบู่เลือด สามารถยับยั้ง *E. coli* O157: H7 ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

100 เปอร์เซ็นต์ภายใน 4-6 ชั่วโมง ในขณะที่ สารสกัดเอทานอลของพญาวานรและสบู่เลือดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Ps. aeruginosa* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ภายในชั่วโมงที่ 6 นอกจากนี้สารสกัดเอทานอลของ แห้ม เถาวัลย์เปรียง ลูกใต้ใบ ชุมเห็ดเทศ และสบู่เลือด สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus, S. epidermidis, St. pyogenes* และ *P. acnes* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 6-8, 4-10, 4-8 และ 12-24 ชั่วโมง ตามลำดับ และสามารถยับยั้งการเจริญของ MRSA 64, MRSA 72 และ MRSA 80 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 4-10 ชั่วโมง เมื่อศึกษาผลของสารสกัดต่อสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย ภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope พบว่า สารสกัดเอทานอลของสบู่เลือด มีผลต่อสัณฐานวิทยาของ *S. aureus* และ *E. coli* O157: H7 โดยมีผลทำให้รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดของพืชทั้งสองชนิดนี้ไม่มีผลต่อรูปร่างเซลล์ของเชื้อ *S. epidermidis,* MRSA 64 และ MRSA 80

จากการศึกษาการดื้อยาของ *S. aureus* จำนวน 10 ไอโซเลท เมื่อทดสอบด้วย oxacillin (1 µg) และ cefoxitin (30 µg) พบว่าเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลท ดื้อต่อยาทั้ง 2 ชนิด และมียีน *mecA* ขนาด 922 bp เมื่อตรวจหาด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction และจากการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *mecA* ในเชื้อ MRSA โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน *mecA* ของ MRSA เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mecA* ของ *S. aureus* subsp. *aureus* USA300_TCH1516 ทุกประการโดยให้ผล Identities เท่ากับ 100%.

การทดสอบผลของสารสกัดเอทานอลต่อการแสดงออกของยีนใน *S. aureus* ด้วยวิธี Quantitative Polymerase Chain Reaction พบว่า สารสกัดเอทานอลของ แห้ม และสบู่เลือดสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *hla* ใน *S. aureus* โดยมีระดับ mRNA ลดลง 12.76 และ 7.38 เท่า สารสกัดเอทานอลของสบู่เลือดสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน α-toxin gene (*hla*) ใน MRSA 80 โดยมีการแสดงออกลดลง 2.65 เท่า สารสกัดเอทานอลของแห้มสามารถลดระดับ mRNA ของ *hla* แต่การลดลงนั้นไม่มีความสัมพันธ์ทางด้านสถิติ เมื่อทดสอบผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีนดื้อยาในเชื้อ MRSA 80 พบว่า สารสกัดเอทานอลของแห้มและสบู่เลือด สามารถยับยั้งระดับ mRNA ของยีน *mecR1* โดยมีการแสดงออกลดลง 1.97 และ 1.79 เท่า ในทางตรงกันข้ามสารสกัดทั้งสองชนิดมีผลต่อการเพิ่มการแสดงออกของยีน *mecI* แต่พบว่าไม่มีนัยสำคัญเมื่อทดสอบทางสถิติ อย่างไรก็ตาม สารสกัดเอทานอลของแห้ม เพิ่มการแสดงออกของยีน *mecA* โดยมีระดับ mRNA เพิ่มขึ้น 7.52 เท่า ในระหว่างที่ สารสกัดเอทานอลของสบู่เลือดไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *mecA* นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเอทานอลของแห้มและสบู่เลือด สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน nuclease A gene *(nucA)* ใน *S. aureus* โดยมีการแสดงออกเพิ่ม 2.21 และ 2.40 เท่า อย่างมีนัยสำคัญตามลำดับ นอกจากนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สาสกัดเอทานอลของแห้มและสบู่เลือดสามารถเพิ่มระดับของ mRNA ของ *nucA* ใน MRSA 80 โดยมีการแสดงออกเพิ่ม 7.57 และ 2.43 เท่า จากการศึกษาการแสดงออกของ penicillin binding protein 2a (PBP2a) โดยวิธี Western blotting พบว่า สารสกัดเอทานอลของแห้ม สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน PBP2a ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 3.13 mg/ml ในระหว่างที่ สารสกัดเอทานอลของสบู่เลือดที่ความเข้มข้น 0.39 mg/ml สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน PBP2a ได้ 59.62 % เมื่อทำการแยกองค์ประกอบของสาร โดยวิธี partition และ column chromatography พบว่า สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ของ แห้มและสบู่เลือด มีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบไม่แตกต่างกับสารสกัดหยาบ และจากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีพบว่า alkaloids และ phenolic เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลักในแห้ม และเมื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี GC/MS พบว่า berberine เป็นองค์ประกอบหลักที่พบในแห้ม ในขณะที่ alkaloids และ phenolic เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลักในสบู่เลือด

นอกจากนี้ เมื่อทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS พบว่าสารสกัดน้ำของ ชุมเห็ดเทศมีค่าการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด เท่ากับ 214.128 mg TE/g extract ในระหว่างที่สารสกัดเอทานอลของฮ่อสะพายควายมีค่าการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด เท่ากับ 77.913 mg GAE/g extract เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH ในขณะที่ สารสกัดน้ำของหนอนตายหยากมีค่าการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเท่ากับ 433.930 mg $FeSO_4$/g extract เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP เมื่อศึกษาปริมาณสารประกอบ phenolic โดยวิธี Folin-Ciocalteau พบว่า สารสกัดเอทานอลของฮ่อสะพายควาย มีปริมาณสูงสุด เท่ากับ 132.454 mg GAE/ g extract จากการศึกษาความสัมพันธ์ของวิธีทดสอบการต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธี และสารประกอบ phenolic ในสมุนไพรทั้ง 22 ชนิด โดยค่าดูค่าสหสัมพันธ์ Pearson's พบว่าวิธี DPPH, ABTS และ ปริมาณสารประกอบ phenolic มีความสัมพันธ์กัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในระหว่างที่ วิธี FRAP ไม่มีความสัมพันธ์กับวิธี ABTS และ DPPH นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดน้ำของลูกใต้ใบ สามารถป้องกันการเสียสภาพของโปรตีน BSA โดยพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การป้องกันการสูญเสียสภาพโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 87.06 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการแยกองค์ประกอบของสาร โดยวิธี partition และ column chromatography พบว่า สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ของ กระเม็งและฮ่อสะพายควายมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นกว่าสารสกัดหยาบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีพบว่า flavonoids และ phenolics เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลักในกระเม็ง ในขณะที่ tannins และ phenolics เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลักในฮ่อสะพายควาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Inhibition of Pathogenic Bacteria Causing Skin Disease and Free Radicals by Some Medicinal Plant Extracts
Author	Miss Wipawan Pukumpuang
Degree	Doctor of Philosophy (Applied Microbiology)
Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Yingmanee Tragoolpua Advisor Asst. Prof. Dr. Narumol Thongwai Co-advisor Asst. Prof. Dr. Sunee Chansakaow Co-advisor

ABSTRACT

Twenty two medicinal plants that related in the use of Thai folklore medicine were selected to evaluate bioactive activity in this study. Plants were extracted by water and 95% ethanol. All medicinal plant extracts were tested for growth inhibitory effect on pathogenic bacteria including *Escherichia coli* O157: H7, *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus,* methicillin resistant *S. aureus* (MRSA), *S. epidermidis, Streptococcus pyogenes* and *Propionibacterium acnes* by agar disc diffusion and broth dilution methods. It was found that the ethanolic extract of *Coscinium fenestratum* and *Stephania venosa* gave the highest antibacterial activity with inhibition zone ranged from 8.3-50.0 mm. MIC and MBC values ranged from 0.03-125 mg/ml. Moreover, four solvents including water, ethanol, methanol and dichloromethane were used to extract and compare the efficacy of antibacterial activity. The result showed that the methanolic extract of *C. fenestratum* gave the highest inhibitory effect with inhibition zone ranged from 12.3-59.0 mm, MIC and MBC values ranged from 0.06-62.5 mg/ml while dichloromethane extract of *S. venosa* gave the highest activity with inhibition zone ranged from 10.3-45.3 mm, MIC and MBC ranged from 0.12-31.3 mg/ml.

Time-killing curves of efficacy of medicinal plants extracts revealed that the ethanolic extract of *Houttuynia cordata, Pseuderanthemum palatiferum and S. venosa* could inhibit growth *E. coli* O157: H7 by 100% within 4-6 hours while the ethanolic

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

extract of *P. palatiferum* and *S. venosa* could inhibit growth of *Ps. aeruginosa* by 100% within 6 hours. Moreover, the ethanolic extracts of *C. fenestratum, Derris scandens, Phyllanthus amarus, Senna alata* and *S. venosa* could inhibit the growth of *S. aureus, S. epidermidis, St. pyogenes* and *P. acnes* by 100% within 6-8, 4-10, 4-8 and 12-24 hours, respectively. Furthermore, these plant extracts also inhibited the growth of MRSA isolate number 64, 72 and 80 by 100% within 4-10 hours. Bacterial cell morphology was observed by Scanning Electron Microscope. It was found that the ethanolic extracts of *S. venosa* could affect to *S. aureus* and *E. coli* O157: H7cell morphology. However, both ethanolic extracts of *C. fenestratum* and *S. venosa* could not affect to *S. epidermidis*, MRSA 64 and MRSA 80 cell morphology.

Ten isolates of *Staphylococcus aureus* was tested to confirm resistance ability using oxacillin (1 µg) and cefoxitin (30 µg) disc susceptibility testing. It was found that all ten isolates were resistance to both antibiotics and carried *mecA* gene (922 bp) when detected by Polymerase Chain Reaction technique. The mutation in *mecA* gene was conducted using nucleotide sequencing and showed that the nucleotide sequence of these MRSA in this study was similar to the reference sequence with 100% identity when compared to *S. aureus* subsp. *aureus* USA300_TCH1516 accession number: CP000730.1.

The effect of ethanolic extracts of medicinal plant extracts on the expression of *S. aureus* gene expression by Quantitative Polymerase Chain Reaction showed that the ethanolic extracts of *C. fenestratum* and *S. venosa* could inhibit the mRNA level of α- toxin gene (*hla*) in *S. aureus* by 12.76 and 7.38 folds, respectively. Moreover, ethanolic extract of *S. venosa* induced strong decrease of *hla* expression level in MRSA 80 by 2.65 fold. The ethanolic extract of *C. fenestratum* could reduce *hla* mRNA level but the reduction was not statistical significant. The efficacies of extracts on the expression of resistant gene in MRSA80 were also performed. It was found that the ethanolic extract of *C. fenestratum* and *S. venosa* plant extracts induced a significant decrease in *mecR1* mRNA level by 1.97 and 1.79 folds, respectively. On the other hand, both plant extract could increase the expression of *mecI* gene but the induction was not statistical significant. However, the ethanolic extract of *C. fenestratum* increased mRNA level of *mecA* gene by 7.52 fold while the ethanolic extract of

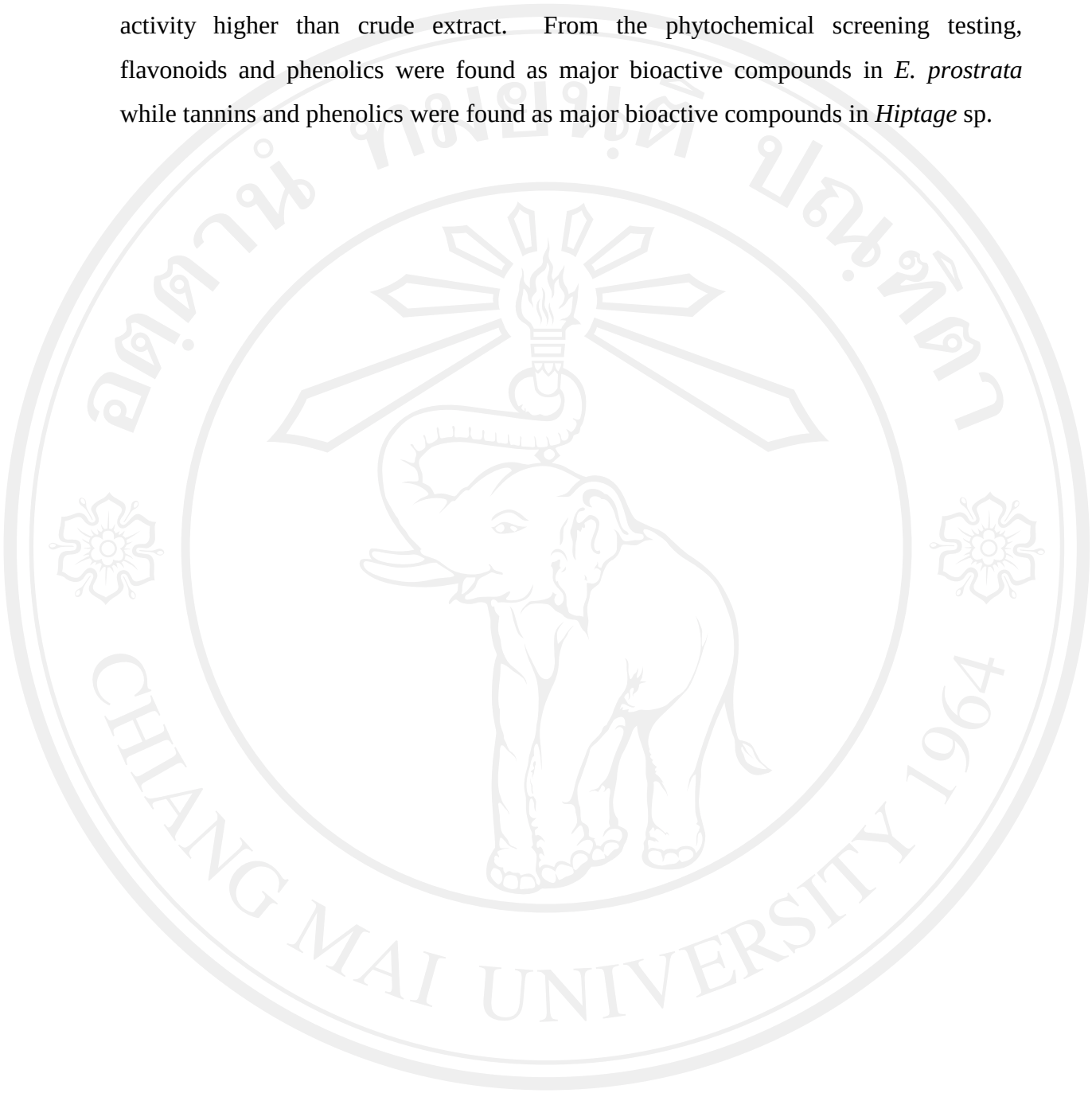
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

S. venosa could not significant effect on *mecA* gene. Ethanolic extracts of *C. fenestratum* and *S. venosa* affected nuclease A gene (*nucA*) in *S. aureus* by significant increase of the mRNA level by 2.21 and 2.40 folds, respectively. In addition, both extracts also increased *nucA* mRNA level by 7.57 and 3.59 folds in MRSA 80. Moreover, the expression of penicillin binding protein 2a (PBP2a) was also performed by Western blotting. It was found that the ethanolic extract of *C. fenestratum* could inhibit the expression of PBP2a protein by 100 % when treating at concentration of 3.13 mg/ml while the ethanolic extract of *S. venosa* at concentration of 0.39 mg/ml inhibited PBP2a expression by 59.62 %. Furthermore, the plants were fractionated using partition and column chromatography methods. It was found that the partial purified fraction of *C. fenestratum* and *S. venosa* had no significant different of antibacterial activity from crude extract. After phytochemical screening testing, alkaloids and phenolics were found as major bioactive compounds in *C. fenestratum*. From GC/MS result, berberine was a major volatile compound in this plant. Moreover, it was also found that alkaloids and phenolics were major bioactive compounds in *S. venosa*.

Additionally, the ABTS assay showed that the aqueous extract of *S. alata* gave the highest activity with TEAC value of 214.128 mg TE/g extract while the ethanolic extract of *Hiptage* sp. showed significant highest with GAE value of 77.913 mg GAE/g extract after determination by DPPH assay. In addition, the aqueous extract of *Stemona* sp. gave the highest ferric reducing activity with EC value of 433.930 mg FeSO4/ g extract when determination by FRAP assay. The total phenolic content using Folin-Ciocalteau assay showed that the ethanolic extract of *Hiptage* sp. had the highest total phenolic content with GAE value of 132.454 mg GAE/g extract. In the present study, Pearson's correlation coefficients were used to evaluate the correlation between three antioxidant activities assay including ABTS, DPPH and FRAP assays and the total phenolic content assay in 22 medicinal plants. It was found that ABTS, DPPH and total phenolic content significantly correlated with each other while FRAP assay was not correlated with ABTS and DPPH assay. Moreover, the aqueous extract of *P. amarus* showed the highest percentage of protection activity against BSA protein damage which was 87.06 % protection. Furthermore, the efficacy plants were fractionated using partition and column chromatography methods. It was found that the partial purified

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

fraction of *Eclipta prostrata* and *Hiptage* sp. had significantly increased in antioxidant activity higher than crude extract. From the phytochemical screening testing, flavonoids and phenolics were found as major bioactive compounds in *E. prostrata* while tannins and phenolics were found as major bioactive compounds in *Hiptage* sp.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved